

トマト果実形成における共発現遺伝子群の研究

著者	尾? 崇一
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第163号
URL	http://hdl.handle.net/10097/51186

おざき そういち _____

氏名（本籍地）	尾崎 崇一
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第163号
学位授与年月日	平成22年3月3日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 生態システム生命科学専攻
論文題目	トマト果実形成における共発遺伝子群の研究
博士論文審査委員	(主査) 教授 柴田 大 輔 教授 東 谷 篤 志 准教授 日出間 純

論文内容の要旨

本研究では、トマト果実の形成時に共発現している遺伝子をバイオインフォマティクスで解析し、候補となる遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子機能を実験的に解明した。

高等植物の研究はシロイヌナズナを中心として進められているが、シロイヌナズナ以外の様々な植物のオミクス情報も蓄積されてきており、それぞれの比較から植物の多様性を解明する研究が進んでいる。ナス科に属すトマト(*Solanum lycopersicum*)は、アブラナ科シロイヌナズナとは進化的に離れていることから、植物の多様性研究に適したモデル植物として注目されている。また、同じナス科にはナス、ジャガイモ、トウガラシなど作物として重要な植物が多数属しており、シロイヌナズナにおける基礎的研究から作物への応用を考える上でも重要なモデル植物である。中でも矮性品種 Micro-Tom は実験スペースを節約できると同時に、世代時間が 70~90 日と短く、蛍光灯で生育させても結実するなど、モデル植物としてのメリットを備えている。本研究では、これらのトマトの特性を活用して研究を行った。

第一章では、non-target なアプローチにより、トマトの共発現遺伝子モジュールを包括的に抽出し、その性質を調査した。根、胚軸、子葉、葉、果実に由来する RNA を用いた 67 枚の Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array のハイブリダイゼーション実験からトマトの遺伝子発現データを得た。さらに、全 10,038 プローブからシグナルの値が有意な 7,644 個のプローブを選抜し、ピアソン相関係数(PCC)を算出した。PCC のデータセットを network-based module-finding algorithm (Ogata et al., Genome Informatics, 23, 117-127, 2009)を用いて解析したところ、計 1,655 プローブからなる 199 の共発現モジュールが同定された。抽出された共発現モジュールのアノテーション情報や gene ontology (GO)情報から、それぞれの共発現モジュールの生物学的意義を推測した。トマトプローブの GO annotation はシロイヌナズナ遺伝子との相同性に基づいて、TAIR GO annotation search を用いることによって取得した。75 モジュールにおいて 1%程度のものが TAIR GO カテゴリーにおいて分類された。

第二章ではモジュールメンバー遺伝子間の共発現関係を例証するために、フラボノイド生合成経路に関係する遺伝子に富むモジュール 064(図 1)に注目した。フラボノイドはさまざまな植物種に広く存在している二次代謝産物であり、色素沈着、シグナル伝達、ストレス抵抗、生殖などに機能することが知られている。また、動物細胞においては抗酸化作用が示唆されるなど、応用的な価値が高いことから特に注目して解析を行った。

このモジュールに属する機能未知遺伝子 Les.2294.2.A1_at は、タンパク質ドメイン検索

によって RING-finger type zinc finger タンパク質をコードしていることが明らかとなった。この zinc finger タンパク質遺伝子を以後 *ZnF* 遺伝子と称する。モジュール 064 において、*ZnF* は chalcone synthase 1B、chalcone synthase 2、chalcone isomerase、flavonoid-3-hydroxylase、flavonol synthase といった複数のフラボノイド合成経路の遺伝子と共発現していた。また、flavonoid 3-glucosyl transferase とも相関が高く、フラボノイド合成の中流から下流の制御に関わる可能性があると推定した。

この仮説を検証するために、この遺伝子(clone ID: LEFL2003DB10)を過剰発現させたトマト(Micro-Tom)を作製した。*ZnF* 過剰発現植物の葉において、4-coumarate CoA ligase、cinnamate 4-hydroxylase、cinnamoyl CoA reductase、chalcone synthase 1、chalcone synthase 2、chalcone isomerase、flavanone 3-hydroxylase 1、flavonol synthase の発現量は野生種よりも大きかった(図2)。一方、モジュールのメンバーでないフラボノイド生合成遺伝子である phenylalanine ammonia-lyase の発現量は大きく変化しなかった。Flavonoid 3'-hydroxylase の発現量は *ZnF* 遺伝子の過剰発現によって減少した。これらの結果によって、zinc finger タンパク質遺伝子がモジュール 064 を構成するフラボノイド生合成経路の上流部分の酵素遺伝子の発現に正の制御をしていることが証明された。

これに伴うフラボノイド代謝産物の蓄積量の変化を調査するため、葉の抽出液を液体クロマトグラフィー質量分析に供した。組換え体のいずれの系統においても kaempferol、quercetin の蓄積量が増加した。また、アントシアニンは組換え体、非組換え体のどちらにおいても検出できなかった。

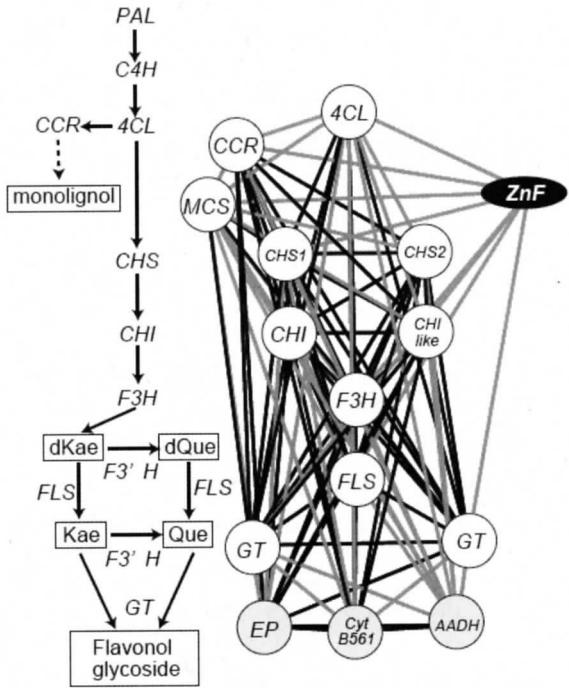


図1 フラボノイド生合成経路とモジュール 064 の共発現ネットワーク

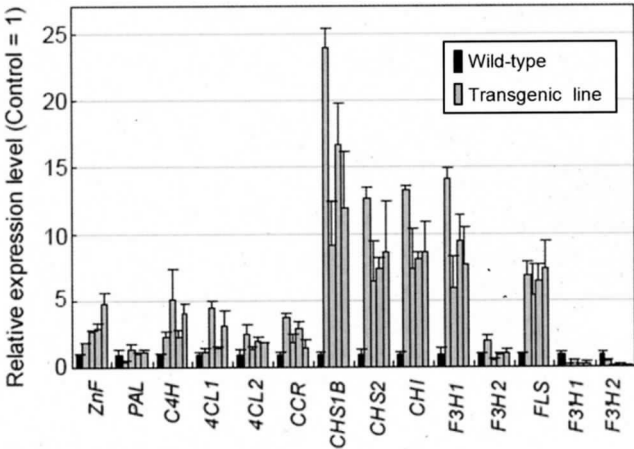


図2 *ZnF* 過剰発現体におけるフラボノイド生合成経路遺伝子の発現量の変化

タマネギ表皮細胞における GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在の解析は、ZnF タンパク質が細胞質に局在していることを示し、通常の転写因子タンパク質ではないことを示唆した。RING-finger type zinc finger ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが報告されていることから、ZnF 遺伝子はフラボノイド生合成遺伝子の発現に対し、転写制御タンパク質とは異なる相互作用を通して正の制御をおこなうという仮説が成り立つ。この例は転写因子ファミリーに属していない機能未知制御遺伝子の機能推定における共発現解析の可能性を示している。

第三章ではセンス-アンチセンス転写産物ペアの相関傾向を解析した。様々な生物種において、タンパク質をコードするゲノム領域の相補鎖が相当数転写されていることが知られているが、トマトにおける研究はなされていない。

Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array 上には 1,402 プローブからなる 701 のセンス-アンチセンスプローブペアが存在するので、これを利用して解析を行った。転写方向が決定できるかどうか検証し、681 の センス-アンチセンスペア (1,362 プローブ)を選抜した。ピアソン相関係数の分布は、681 センス-アンチセンスペア の相関係数の平均(0.40)は、ランダムに選んだプローブペアの相関係数の平均(0.02)よりも高かった。これらの結果は、トマトのセンス-アンチセンス転写産物ペアが高度に共発現している可能性を示している。このことはマウスのセンス-アンチセンス転写産物について報告された結果と一致する。双方向性相関順位の分布は、センスプローブから対応するアンチセンスプローブへの相関順位は高く、アンチセンスプローブから対応するセンスプローブへの相関順位はより高いことを示している。さらに、non-target のアプローチによってセンス-アンチセンスペアを含む複数の共発現モジュールを同定した。Non-target のアプローチによって NATs の共発現関係が抽出されたことは、NATs の発現が全遺伝子発現のダイナミズムの中でも注目すべき特徴を持つことを示唆している。

センス-アンチセンス転写産物の共発現を例証するために、モジュール 002 に注目した。このモジュールは CYP84A1 と CYP75B1 のセンス-アンチセンスプローブペアを含む。この相関関係を検証するために、CYP84A1 と CYP75B1 のアンチセンス転写産物がトマト組織に存在するかどうか調査したところ、Strand 特異的プライマーを用いた RT-PCR によって葉と根において実際に存在したことが証明された。

本研究によってトマト果実形成時における共発現遺伝子の基本的な性質を明らかにした。特に、ZnF 遺伝子の機能解析は、フラボノイド生合成経路の研究に大きく貢献すると期待できる。さらに、トマトにおけるアンチセンス転写産物による発現制御の可能性も示唆した。

論文審査結果の要旨

植物の果実形成に関する遺伝子発現機構を解明するにあたり、トマトを実験材料として研究を進め、特に、遺伝子の共発現性に注目し、トランスクリプトミクスの手法を活用した研究を行った。共発現遺伝子群を解明するために、根、胚軸、子葉、葉、果実に由来する RNA を用いた 67 枚の Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array のハイブリダイゼーション実験を行い、199 の共発現モジュールを同定した。モジュールメンバー遺伝子間の共発現関係を例証するために、フラボノイド生合成経路に関係する遺伝子に富むモジュール 064 に注目し、詳細な解析を行った。その結果、このモジュールに属する機能未知遺伝子 Les.2294.2.A1_at は、タンパク質ドメイン検索によって RING-finger type zinc finger タンパク質をコードしており、フラボノイド合成の中流から下流の制御に関わる可能性があると推定した。そこで、この遺伝子を過剰発現させたトマトを作製し、詳細な研究を行い、モジュール 064 を構成するフラボノイド生合成経路の上流部分の酵素遺伝子の発現を正に制御をしていることを示した。また、タマネギ表皮細胞における GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在の解析により、本 ZnF タンパク質は細胞質に局在していることを示し、通常の転写因子タンパク質とは異なる様式で制御に関わることを示唆した。さらに研究を進め、センス-アンチセンス転写産物ペアの相関傾向を解析し、681 の センス-アンチセンスペア (1,362 プローブ)を選抜した。センス-アンチセンス転写産物の共発現を例証するために、モジュール 002 に注目し、実際に CYP84A1 と CYP75B1 のアンチセンス転写産物がトマト組織に存在することを示した。本研究は、筆頭著者として DNA Research 誌に「Coexpression Analysis of Tomato Genes and Experimental Verification of Coordinated Expression of Genes Found in a Functionally Enriched Coexpression Module」として発表した。

本研究によってトマト果実形成時における共発現遺伝子の基本的な性質を明らかにした。最先端の生物科学の手法を取り入れて、植物の果実形成における分子生物学に貢献できる研究成果を挙げており、また、それらは論文として国際誌に掲載されていることから、独自に研究を展開するに足る研究者としての能力を有していると判断でき、東北大学大学院生命科学研究科の博士(生命科学)号に資する。